



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類7 C12N 15/12, 5/10, G01N 33/50, 33/15	A1	(11) 国際公開番号 WO00/40720 (43) 国際公開日 2000年7月13日(13.07.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP00/00010 (22) 国際出願日 2000年1月5日(05.01.00) (30) 優先権データ 特願平11/2807 1999年1月8日(08.01.99) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 住友化学工業株式会社 (SUMITOMO CHEMICAL COMPANY, LIMITED)[JP/JP] 〒541-0041 大阪府大阪市中央区北浜四丁目5番33号 Osaka, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 松永治之(MATSUNAGA, Haruyuki)[JP/JP] 〒552-0004 大阪府大阪市港区夕風1-5-21-5-C Osaka, (JP) 大江師久(OOE, Norihisa)[JP/JP] 〒530-0041 大阪府大阪市北区天神橋1-19-16-403 Osaka, (JP) (74) 代理人 青山 葆, 外(AOYAMA, Tamotsu et al.) 〒540-0001 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMPビル 青山特許事務所 Osaka, (JP)		(81) 指定国 US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE) 添付公開書類 国際調査報告書
(54)Title: CELLS FOR MEASURING ABILITY TO PROMOTE TRANSCRIPTION (54)発明の名称 転写促進能の測定用細胞 (57) Abstract Cells with the expression of a gene encoding a ligand-responsive transcriptional regulatory factor and having the following genes (a) and (b) transferred into the chromosomes thereof: (a) a reporter gene ligated to the downstream of the recognition sequence of the above ligand-responsive transcriptional regulatory factor and the base sequence required in the initiation of the transcription; and (b) another reporter gene encoding a protein distinguishable from the protein encoded by the above reporter gene and ligated to the downstream of a promoter the transcriptional activity of which is not altered when coming into contact with the ligand of the above ligand-responsive transcriptional regulatory factor; etc. Thus, the activity of a test substance on the ability to promote the transcription of the ligand-responsive transcriptional regulatory factor can be conveniently and accurately measured.		

本発明は、リガンド応答性転写調節因子をコードする遺伝子を発現し、以下の

(a) および (b) の遺伝子が染色体に導入されてなる細胞：

(a) 前記リガンド応答性転写調節因子の認識配列と転写開始に必要な塩基配列との下流に接続されてなるレポーター遺伝子、

(b) 前記レポーター遺伝子のコードするタンパク質と判別可能なタンパク質をコードし、前記リガンド応答性転写調節因子のリガンドの接触により転写活性が変化しないプロモーターの下流に接続されてなるレポーター遺伝子

等に関する。本発明により、リガンド応答性転写調節因子の転写促進能に対する、被験物質の活性をより簡便で精度高く測定することが可能となる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AG	アンティグア・バーブーダ	DZ	アルジェリア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AL	アルバニア	EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AU	オーストラリア	FR	フランス	LS	レソト	SK	スロヴァキア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GE	グルジア	MA	モロッコ	TD	チャード
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BY	ベラルーシ	GW	ギニア・ビサウ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
CA	カナダ	HR	クロアチア	ML	マリ	TZ	タンザニア
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CH	スイス	IE	アイルランド	MW	マラウイ	US	米国
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	IN	インド	MZ	モザンビーク	VN	ヴェトナム
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラヴィア
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	ZA	南アフリカ共和国
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノールウェー	ZW	ジンバブエ
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド		
CZ	チェッコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		

明 細 書

転写促進能の測定用細胞

5

発明の背景

発明の属する技術分野

10

本発明は、転写促進能の測定用細胞に関する。詳しくは、リガンド応答性転写調節因子の転写促進能に対する化学物質の活性を測定することのできる細胞に関する。

従来の技術

15

リガンド応答性転写調節因子は、リガンドと結合すると活性化されて、染色体上の標的遺伝子の転写調節領域に存在するリガンド応答性転写調節因子認識配列に結合し、該標的遺伝子の転写を促進する機能を有するタンパク質であって、生物の恒常性の維持、生殖、発育と成長、細胞分化、エネルギー代謝、薬物代謝などに重要な役割を果たしている。このようなリガンド応答性転写調節因子による標的遺伝子の転写調節が正常に行われなくなると、該遺伝子の発現量に異常を来し、種々の疾患や異常の原因となる場合があることが知られている。

20

そこで、かかる疾患や異常の予防や治療に有用な薬剤を開発するために、また、かかる疾患や異常を惹起する原因となる物質の摂取を制限するために、リガンド応答性転写調節因子の転写促進能を変化させる活性を有する物質の探索が望まれており、該因子の転写促進能に対する化学物質の活性を調べるための方法の開発が試みられている。例えば、リガンド応答性転写調節因子認識配列の下流に結合されたレポーター遺伝子を細胞に一過性に導入し、該細胞に被験物質を接触させ培養した際の前記レポーター遺伝子の発現量を測定することにより、リガンド応答性転写調節因子の転写促進能に対する被験物質の活性を調べる方法等が提案されている。

25

しかしながら、このような方法においては、試験操作のばらつきや、被験物質

の細胞に対する影響等による細胞数の変化が原因となつて、試験毎に測定誤差が生じることがあつた。そして、精度の高い測定値を得る為には、試験毎に細胞数を数えたり細胞由来のタンパク質量を測定したりすることにより細胞数を把握し、実測値を補正する必要がある、操作が極めて煩雑であつた。また、被験物質が、
5 遺伝子の転写調節系に対してリガンド応答性転写調節因子を介さずに活性を示す場合には、測定値がリガンド応答性転写調節因子の転写促進能に対する被験物質の活性を正確に反映していないこともあつた。そこで、リガンド応答性転写調節因子の転写促進能に対する被験物質の活性を測定するためのより簡便で精度の高い方法の開発が切望されていた。

10

発明の概要

本発明者らは、かかる状況の下、鋭意検討した結果、リガンド応答性転写調節因子の転写促進能の指標となるレポーター遺伝子と、細胞数の指標となるレポーター遺伝子とを染色体上に有する細胞を用いることにより、リガンド応答性転写
15 調節因子の転写促進能に対する被験物質の活性を、より簡便に精度よく測定できることを見出し、本発明に至った。

即ち、本発明は、

1) リガンド応答性転写調節因子をコードする遺伝子を発現し、以下の (a) および (b) の遺伝子が染色体に導入されてなる細胞 (以下、本発明細胞と記す。)、
20

(a) 前記リガンド応答性転写調節因子の認識配列と転写開始に必要な塩基配列との下流に接続されてなるレポーター遺伝子 (以下、リガンド応答性レポーター遺伝子と記す。)、

25 (b) 前記レポーター遺伝子のコードするタンパク質と判別可能なタンパク質をコードし、前記リガンド応答性転写調節因子のリガンドの接触により転写活性が変化しないプロモーターの下流に接続されてなるレポーター遺伝子 (以下、細胞数レポーター遺伝子と記す。)、

2) アリルハイドロカーボンレセプター遺伝子を発現し、以下の (a) および

(b) の遺伝子が染色体に導入されてなる細胞、

(a) アリルハイドロカーボンレセプターの認識配列と転写開始に必要な塩基配列との下流に接続されてなるレポーター遺伝子、

5 (b) 前記レポーター遺伝子のコードするタンパク質と判別可能なタンパク質をコードし、前記リガンド応答性転写調節因子のリガンドの接触により転写活性が変化しないプロモーターの下流に接続されてなるレポーター遺伝子、

3) アリルハイドロカーボンレセプター遺伝子を発現し、以下の (a) および (b) の遺伝子が染色体に導入されてなる細胞：

10 (a) アリルハイドロカーボンレセプターの認識配列と転写開始に必要な塩基配列との下流に接続されてなるレポーター遺伝子、

(b) 前記レポーター遺伝子のコードするタンパク質と判別可能なタンパク質をコードし、ダイオキシンの接触により転写活性が変化しないプロモーターの下流に接続されてなるレポーター遺伝子、

15 4) アリルハイドロカーボンレセプター遺伝子およびArnt遺伝子を発現し、以下の (a) および (b) の遺伝子が染色体に導入されてなる細胞：

(a) アリルハイドロカーボンレセプターの認識配列と転写開始に必要な塩基配列との下流に接続されてなるレポーター遺伝子、

20 (b) 前記レポーター遺伝子のコードするタンパク質と判別可能なタンパク質をコードし、前記リガンド応答性転写調節因子のリガンドの接触により転写活性が変化しないプロモーターの下流に接続されてなるレポーター遺伝子、

5) リガンド応答性転写調節因子の転写調節を受けるレポーター遺伝子の発現量を測定するレポーターアッセイにおいて、リガンド応答性転写調節因子の転写促進能に対する被験物質のアゴニスト活性またはアンタゴニスト活性を評価するための前項1)、2)、3) または4) のいずれかに記載の細胞の使用、

25 6) リガンド応答性転写調節因子の転写促進能に対する被験物質のアゴニスト活性を評価する方法であって、

(1) 前項1)、2)、3) または4) のいずれかに記載の細胞を被験物質の存在下に培養し、当該細胞におけるレポーター遺伝子の発現量を測定する工程、

(2) リガンドの接触により転写活性が変化しないプロモーターの下流に接

続されてなるレポーター遺伝子の発現量の測定値に基づいて、リガンド応答性転写調節因子の認識配列と転写開始に必要な塩基配列との下流に接続されてなるレポーター遺伝子の発現量の測定値を選択する工程、

(3) 工程(2)で選択されたレポーター遺伝子の発現量の測定値が、前記被験物質非存在下における当該レポーター遺伝子の発現量の測定値よりも高い場合に、該被験物質が前記リガンド応答性転写調節因子の転写促進能に対してアゴニスト活性を有すると評価する工程、を含む方法、

7) リガンド応答性転写調節因子の転写促進能に対する被験物質のアンタゴニスト活性を評価する方法であって、

(1) 前項1)、2)、3)または4)のいずれかに記載の細胞を、該リガンド応答性転写調節因子のリガンドと被験物質との存在下に培養し、当該細胞におけるレポーター遺伝子の発現量を測定する工程、

(2) リガンドの接触により転写活性が変化しないプロモーターの下流に接続されてなるレポーター遺伝子の発現量の測定値に基づいて、リガンド応答性転写調節因子の認識配列と転写開始に必要な塩基配列との下流に接続されてなるレポーター遺伝子の発現量の測定値を選択する工程、

(3) 工程(2)で選択されたレポーター遺伝子の発現量の測定値が、前記リガンドは存在し前記被験物質は存在しない条件下における当該レポーター遺伝子の発現量の測定値よりも低い場合に、該被験物質が前記リガンド応答性転写調節因子の転写促進能に対してアンタゴニスト活性を有すると評価する工程、を含む方法、および

8) 前項1)、2)、3または4のいずれかに記載の細胞を含有する測定キット、を提供するものである。

図面の簡単な説明

図1は、アシルハイドロカーボンレセプターの認識配列および転写開始に必要な塩基配列との下流に接続されてなるレポーター遺伝子を含むプラスミドpGV-

Ya-XREx5の構造を示す図である。lucはホタルルシフェラーゼ遺伝子を、Amp^r はアンピシリン耐性遺伝子を、XREx5は、ラットグルタチオンS-トランスフェラーゼYaサブユニット遺伝子の5' 上流領域に存在するアリルヒドロカーボンレセプターの認識配列がタンデムに5つ連結されてなる塩基配列を、Ya-promoterは、
5 ラットのグルタチオンS-トランスフェラーゼYaサブユニット遺伝子の5' 上流領域由来のTATA含有プロモーター領域（転写開始点を1として、-164番目から+53番目までの塩基からなる領域）をそれぞれ表す。

発明の詳細な説明

10 以下、さらに詳細に本発明を説明する。

本発明において、「リガンド応答性転写調節因子」とは、リガンドの結合により活性化されるレセプター型転写調節因子を意味し、具体的には、例えば、エストロゲン、アンドロゲンもしくはグルココルチコイド等のステロイドホルモン、
15 甲状腺ホルモン、ビタミンD₃ もしくはレチノイン酸等の脂溶性ビタミン、またはプロスタノイドなどのレセプターをはじめとする核内ホルモンレセプターや、ダイオキシンのレセプター（アリルヒドロカーボンレセプター；以下、Ahレセプターと記す。）、エグダイソンレセプター等の昆虫ホルモンのレセプターなどがあげられる。

20 本発明細胞は、例えば、目的とするリガンド応答性転写調節因子をコードする遺伝子を発現する細胞に、リガンド応答性レポーター遺伝子を含むDNAと細胞数レポーター遺伝子を含むDNAとを導入し、これらの遺伝子が染色体上に導入された細胞を選抜することにより調製することができる。

本発明細胞を調製するに際し、用いることのできる細胞としては、例えば、ヒト、
25 ト、マウス、ラット等の哺乳類動物由来の細胞、昆虫類動物由来の細胞、酵母細胞などの真核生物細胞があげられる。操作性や再現性を考慮すると、安定に継代可能な細胞が好ましい。より具体的には、例えば、ヒト由来のHeLa細胞、ヒト由来のMCF7細胞、ヒト由来のHepG2細胞、マウス由来のNIH3T3細胞、マウス由来のHepalclc7細胞、ラット由来H4IIE細胞[いずれも、American Type Culture

Collection (ATCC) から入手可能]などをあげることができる。

目的とするリガンド応答性転写調節因子を産生していない細胞には、目的とするリガンド応答性転写調節因子をコードする遺伝子を発現可能な形となるように導入する。かかるリガンド応答性転写調節因子をコードする遺伝子は、天然に存在する遺伝子であってもよいし、人為的に改変された遺伝子であってもよく、例えば異なる転写調節因子の機能ドメインが連結されてなるタンパク質をコードする遺伝子であってもよい。該遺伝子は、その翻訳開始コドンATGの上流に、Kozakのコンセンサス配列 (Nucleic Acids Res., 12, 857-872 (1984)) が連結されていてもよい。このようなリガンド応答性転写調節因子の遺伝子のDNAは、例えば、該因子をコードするDNAを増幅するためのオリゴヌクレオチドを、既知の塩基配列に基づいて設計して作製し、作製されたオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いるポリメラーゼチェーン反応 (以下、PCRと記す。) を行うことなどにより調製することができる。かかるPCRにおいて鋳型として使用されるDNAとしては、例えば、各種生物由来の市販のcDNAをあげることができる。

得られたリガンド応答性転写調節因子の遺伝子のDNAは、例えば、発現可能な形でプロモーターと接続されるようにベクターに挿入し、得られたベクターのDNAを細胞に導入するとよい。プロモーターとしては、導入される細胞で機能可能な、即ち転写開始能を有するプロモーターであって、例えば、当該細胞が真核生物細胞の場合、ラウス肉腫ウィルス (RSV) プロモーター、サイトメガロウィルス (CMV) プロモーター、シミアンウィルス (SV40) の初期もしくは後期プロモーター等があげらる。ベクターとしては大腸菌等の遺伝子工学的技術に適した微生物内で機能可能な複製起点および薬剤耐性遺伝子を有するプラスミド等があげられる。具体的には、上記のようなプロモーターを有しその下流に遺伝子挿入部位を有する市販の発現用ベクター等をあげることができる。

かかるリガンド応答性転写調節因子をコードする遺伝子を含むDNAを、後記のようにして細胞へ導入し、形質転換体を取得する。好ましくは、導入された遺伝子が染色体に導入されてなる安定形質転換体を取得する。尚、前記DNAは、後記するレポーター遺伝子を含むDNAと同時に細胞へ導入されてもよいし、別々に導入されてもよい。

また、目的とするリガンド応答性転写調節因子をコードする遺伝子を発現する細胞に、前記と同様にして、該因子をコードする遺伝子を発現可能な形となるように導入することにより、該因子の発現量を高めてもよい。また、例えば、核内ホルモンレセプターのコアクチベーターなど、リガンド応答性転写調節因子の転写調節を受ける遺伝子の転写量を増大させる機能を有するタンパク質をコードする遺伝子を細胞に導入して発現させることにより、リガンド応答性転写調節因子の転写促進能を増強してもよい。

具体的には例えば、目的とするリガンド応答性転写調節因子がAhレセプターである場合には、本発明細胞の調製に使用することのできる細胞として、Ahレセプター遺伝子、好ましくは前記遺伝子およびArnt[Ah receptor nuclear translocator. Science, 252, 954-958(1991)]遺伝子の両者、を発現する細胞であって、例えば、哺乳類動物由来の細胞、昆虫類動物由来の細胞、酵母細胞などの真核生物細胞をあげることができる。より具体的には、マウス由来のHepalclc7細胞、ラット由来のH4IIE細胞、ヒト由来のHepG2細胞などのAhレセプター遺伝子内在性の細胞があげられる。また、酵母細胞、CV-1細胞等のAhレセプター遺伝子非内在性細胞またはAhレセプター遺伝子の発現量の少ない細胞は、該細胞に前記のようにしてAhレセプター遺伝子を導入し該遺伝子の発現量を高めてから使用すればよい。細胞に導入されるAhレセプター遺伝子としては、ヒト由来のAhレセプター遺伝子[GenBank Accession No. L19872、Mol. Pharmacol. 44, 911-917(1993)]、マウス由来のAhレセプター遺伝子[GenBank Accession No. M94623、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 8185-8189(1992)]、またはラット由来のAhレセプター遺伝子[GenBank Accession No. M94623、Nucleic Acids Res.; 22, 3038-3044(1994)]等があげられる。

リガンド応答性レポーター遺伝子を含むDNAは、例えば、上流から順に、目的とするリガンド応答性転写調節因子の認識配列を有するDNA、転写開始に必要な塩基配列を有するDNAおよびレポーター遺伝子のDNAが連結されるようにこれらのDNAを接続することにより調製することができる。

かかるリガンド応答性レポーター遺伝子の調製に使用されるレポーター遺伝子としては、その遺伝子にコードされるタンパク質の有する酵素活性等に基づき発

現量の測定が容易な遺伝子が好ましく、例えば、ホタルルシフェラーゼ、ウミシイタケルシフェラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、アルカリホスファターゼなどをコードする遺伝子があげられる。このようなレポーター遺伝子のDNAは、例えば、これらのレポーター遺
5 伝子を含む市販のプラスミドのDNAを制限酵素消化して目的とするDNAを単離すること等により得ることができる。

「リガンド応答性転写調節因子の認識配列」とは、リガンド応答性転写調節因子によって発現量が調節される標的遺伝子の転写調節領域に存在する特定の塩基配列であって、リガンドとリガンド応答性転写調節因子との複合体が、該配列を
10 認識しここに結合すると、その下流に存在する標的遺伝子の転写が促進される。該配列は、通常、対応するリガンドの種類により、グルココルチコイド応答性配列 (GRE; glucocorticoid responsive element、Nature., 318, 635-641 (1985))、エストロゲン応答性配列 (ERE; estrogen responsive element)、ダイオキシン
15 応答性配列 [DRE; Dioxin responsive element、J. Biol. Chem., 263, 17221-17224 (1988)、Xenobiotic responsive element (XRE) と呼ばれることもある。] などに区別される。具体的には例えば、ダイオキシン応答性配列である、Ahレセプターの認識配列としては、チトクロムP4501A1遺伝子 [cyp1A1、J. Biol.
Chem., 263, 17221-17224 (1988)、Nucleic Acids Res., 15, 4179-4191 (1987)]、グルタチオンS-トランスフェラーゼYaサブユニット遺伝子 [Proc. Natl.
20 Acad. Sci. USA, 87, 3826-3830 (1990)]、UDP-グルクロニルトランスフェラーゼ遺伝子 [J. Biol. Chem., 271, 3952-3958 (1996)] などの哺乳動物由来の遺伝子の5'上流領域の塩基配列をあげることができる。また、ダイオキシン応答配列のコンセンサス配列 [コア配列: 5'-(T/A)GCGTG、J. Biol. Chem., 271, 3952-3958 (1996)] を1回以上含む塩基配列をあげることができる。エストロゲン応答性
25 配列である、エストロゲンレセプターの認識配列としては、例えば、アフリカツメガエルのビテログニン遺伝子の5'上流領域の塩基配列 (Cell., 57, 1139-1146) 等をあげることができる。また、エストロゲン応答配列のコンセンサス配列 [5'-AGGTCAnnnTGACCTT-3'] を1回以上含む塩基配列をあげることができる。尚、十分な転写制御能を得るには、前記のようなコンセンサス配列は通常2~5程度タンデ

ムに連結されていることが好ましい。かかる塩基配列を有するDNAは、化学合成するか、PCR法などにより増幅しクローニングすること等により調製することができる。

「転写開始に必要な塩基配列」としては、TATAボックスおよび転写開始のリーダー配列を有する塩基配列であって、例えば、チミジンキナーゼ遺伝子 (tk) の5' 上流領域の塩基配列、グルタチオンS-トランスフェラーゼYaサブユニット遺伝子の5' 上流領域（例えば、転写開始点を1として、-164番目の塩基～+66番目の塩基を含む領域、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 3826-3830 (1990)）の塩基配列、チトクロムP4501A1遺伝子の5' 上流領域（例えば、転写開始点を1として、-70番目の塩基～+120番目の塩基を含む領域、Eur. J. Biochem., 159, 219-225 (1986)）の塩基配列等があげられる。このような塩基配列を有するDNAは、例えば、前記のような領域をコードするDNAを増幅するためのオリゴヌクレオチドを、既知の塩基配列に基づいて設計して作製し、作製されたオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いるPCRを行うことなどにより調製することができる。

細胞数レポーター遺伝子を含むDNAは、例えば、目的とするリガンド応答性転写調節因子のリガンドの接触により転写活性が変化しないプロモーターのDNAと、レポーター遺伝子のDNAとを接続することにより調製することができる。

細胞数レポーター遺伝子に使用されるレポーター遺伝子としては、その遺伝子にコードされるタンパク質の有する酵素活性等により発現量の測定が容易な遺伝子が好ましく、前記のリガンド応答性レポーター遺伝子に使用されるレポーター遺伝子がコードするタンパク質と判別可能なタンパク質をコードする異なるレポーター遺伝子を用いる。判別は、例えば、酵素活性や基質特異性の違い等により行なうとよい。このようなレポーター遺伝子のDNAは、例えば、これらのレポーター遺伝子を含む市販のプラスミドのDNAを制限酵素消化して目的とするDNAを単離すること等により得ることができる。

「リガンド応答性転写調節因子のリガンドの接触により転写活性が変化しないプロモーター」とは、上記のようなリガンド応答性転写調節因子の認識配列の制御を受けず構成的な転写能を有するプロモーターであって、例えば、tkプロモーター、RSVプロモーター、CMVプロモーター等があげられる。このようなプロモ-

ターのDNAは、例えば、これらのプロモーターを含む市販のプラスミドのDNAを制限酵素消化して目的とするDNAを単離すること等により得ることができる。

5 このようなプロモーターを含む市販のプラスミドの該プロモーターの下流に、前記のレポーター遺伝子のDNAを挿入することにより、細胞数レポーター遺伝子を含むDNAを調製することもできる。

10 リガンド応答性レポーター遺伝子を含むDNAと、細胞数レポーター遺伝子を含むDNAとを、それぞれプラスミド等のベクターに組込んで前記の細胞に導入し、これらのレポーター遺伝子が染色体に導入されてなる細胞を選抜することにより、本発明細胞を調製することができる。具体的には、例えば、目的とするリガンド応答性転写調節因子がAhレセプターである場合には、チトクロムP450 1A1遺伝子の5'上流領域由来のダイオキシン応答配列を含む塩基配列と、グルタチオンS-トランスフェラーゼYaサブユニット遺伝子の5'上流領域由来の転写開始に必要な塩基配列との下流に接続されてなるホタルルシフェラーゼ遺伝子（リガンド応答性レポーター遺伝子）が組み込まれたプラスミド、および、tkプロモーターの下流に接続されてなるウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子（細胞数レポーター遺伝子）が組み込まれたプラスミドを作製し、これらをAhレセプター遺伝子内在性のHepalclc7細胞に導入する。このとき、これらのレポーター遺伝子が導入された細胞の選抜を容易にするために、薬剤耐性遺伝子等の選抜マーカー遺伝子の発現プラスミドを同時に導入してもよい。このようにして使用することのできる薬剤耐性遺伝子としては、例えば、ネオマイシン耐性（アミノグリコシドホストランスフェラーゼ）遺伝子、ブラストサイジンS耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子などがあげられる。

15 20

25 前記の両レポーター遺伝子の組込まれたプラスミドのDNAを、例えば、哺乳類動物由来の細胞に導入するには、例えば、まず、細胞を培養容器に播き（ $10^5 \sim 10^7$ 細胞／直径6～10cmシャーレ）、5～10 (v/v) %程度の血清を含有する α MEM培地等を用いて、5%CO₂ および飽和湿度条件下に37°Cで数時間～一晚程度培養する。このようにして培養した細胞へ、レポーター遺伝子の組込まれたプラスミドDNAを導入する。細胞へのDNA導入法としては、一般的なりポフェクション法、

DEAE-デキストラン法、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法などをあげることができる。具体的には、例えば、市販のリポフェクチン（GIBCO-BRL社製）を用いる場合には、添付のマニュアルに従って操作を行ない、導入するプラスミドDNAの量、リポフェクチンの量、細胞の種類、細胞の数などは、予備検討を行い最適条件を求めておくといよい。レポーター遺伝子の組込まれたプラスミドと同時に薬剤耐性遺伝子を含むプラスミドを導入する場合には、薬剤耐性遺伝子を含むプラスミドDNAの量をレポーター遺伝子の組込まれたプラスミドのDNAの量の1/5～1/10程度にすると良い場合もある。プラスミドDNAとしては、CsCl密度勾配遠心法で精製したDNAまたはそれと同程度の純度のDNAを用い、本発明細胞の調製に必要な領域（リガンド応答性転写調節因子の認識配列、プロモーター、レポーター遺伝子、および選抜マーカー遺伝子等）に認識部位の存在しない制限酵素であらかじめ消化して直鎖化したプラスミドDNAを用いてもよい。プラスミドDNAを細胞に導入した後、培地を血清含有培地に交換し、1晩～2日間程度培養を続ける。次に、細胞を常法に準じてトリプシン処理等によって培養容器から剥がして新たな培養容器に播種する。播種後直ちに、または1日間～2日間培養した後、培地を、細胞へ導入された選抜マーカー遺伝子に対応する条件の培地に交換し、非形質転換細胞が死滅して形質転換細胞に由来するコロニーが適当な大きさになるまで、選抜マーカー遺伝子に対応する条件の培地中で培養を続ける。この間、必要に応じて培地交換を1～2回/週の割合で行う。このような操作を行なうことにより、導入されたレポーター遺伝子が細胞内の染色体上に組み込まれ、レポーター遺伝子を安定に細胞内に保持する細胞を得ることができる。尚、必要に応じて、前記のようなレポーター遺伝子の導入操作を繰り返してもよい。

導入されたレポーター遺伝子が細胞内の染色体上に組み込まれたことを確認するには、当該細胞のゲノムDNAを通常の遺伝子工学的方法に従い調製し、導入されたレポーター遺伝子の部分塩基配列を有するDNA断片をプライマーやプローブとしたPCR、サザンハイブリダイゼーション等の方法を利用して、当該レポーター遺伝子の存在を検出すればよい。

次いで、このようにして得られた細胞におけるレポーター遺伝子の発現量のリ

5 ガンド応答性を指標にして、リガンド応答性転写調節因子の転写促進能に対する被験物質のアゴニストまたはアンタゴニスト活性を測定するために好ましい細胞を選択することができる。具体的には、まず、このようにして得られたコロニーを複数に分割して植え直し、細胞を増殖させてから、その一部に、目的とするリガンド応答性転写調節因子のリガンドの溶液を添加して（リガンド添加区）4時間～2日間程度培養した後、リガンド応答性レポーター遺伝子および細胞数レポーター遺伝子の発現量を測定する。また、対照として、前記の細胞の別の一部に、前記リガンド溶液の調製に用いられた溶媒のみを添加して（対照区）同様に培養し、それぞれのレポーター遺伝子の発現量を測定する。

10 レポーター遺伝子の発現量の測定法は、使用されるレポーター遺伝子の種類にもよるが、一般的には、測定対象の細胞に細胞溶解剤を添加して細胞抽出液を調製し、得られた抽出液に含まれる、レポーター遺伝子にコードされるタンパク質の量を測定する。例えば、レポーター遺伝子にコードされるタンパク質が酵素活性を有する場合には、該酵素に特異的な基質とレポーター遺伝子にコードされるタンパク質が存在する細胞抽出液とを反応させた後、残存する基質の量または反応産物の量を、その発光量、蛍光吸光度、吸光度を指標にして測定する。具体的には、例えば、レポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子を用いた場合には、ルシフェラーゼの基質であるルシフェリンと細胞抽出液とを反応させると、細胞抽出液中のルシフェラーゼ量に比例した強度で発光する。従って、この発光強度をルミノメーターなどの測定装置で測定することにより、細胞抽出液中のルシフェラーゼの量、ひいては、ルシフェラーゼ遺伝子の発現量を知ることができる。

20 それぞれのレポーター遺伝子の発現量について、リガンド添加区における発現量から対照区における発現量を差し引くことにより、リガンドとの接触によるレポーター遺伝子の発現量の増大量を求める。そして、リガンドとの接触によるリガンド応答性レポーター遺伝子の発現量の増大量が、対照区における発現量の少なくとも2倍以上、好ましくは10倍以上であった細胞を選択する。さらに、本発明細胞においては、細胞数レポーター遺伝子の発現量がリガンドの接触により変化しないことが好ましいことから、リガンドの接触による細胞数レポーター遺伝子の発現量の増大量が、同じリガンドの接触によるリガンド応答性レポーター遺

伝子の発現量の増大量の少なくとも半分以下である細胞を選択するとよい。尚、このようにして得られたコロニーが単一の形質転換細胞で構成されていない場合には、該細胞を希釈してさらに培養し、単一の細胞からなるコロニーを選択する。

5 以上のようにして得られる本発明細胞を用いて、リガンド応答性転写調節因子の転写促進能に対する被験物質のアゴニスト活性またはアンタゴニスト活性を測定することができる。

例えば、本発明細胞を96ウェルプレートに1ウェルあたり $10^3 \sim 10^4$ 程度植え、5
10 ~ 10 (v/v)%となるよう血清を含有する培地 (α MEM培地等) を100 \sim 200 μ L添加し、5% CO_2 および飽和湿度条件下に37 $^\circ\text{C}$ で数時間 \sim 1晩程度培養する。次に、被験物質を溶媒に溶解させた溶液、または溶媒のみを最終濃度が0.5 (v/v)% \sim 2 (v/v)%以下になるように添加する。溶媒にはジメチルスルフォキシド (DMSO)、エタノール等を用いることができ、細胞への影響が少ない点で、DMSOの使用が望ましい。被験物質が水溶液である場合には、ポアサイズ20 μ mのフィルターで濾過滅菌した後、終濃度10 (v/v)%以下になるように上記培養系に添加する。被験物質を添加
15 した後、4時間 \sim 2日間程度培養を続け、前記した方法によりリガンド応答性レポーター遺伝子および細胞数レポーター遺伝子の発現量を測定する。

細胞数レポーター遺伝子の発現量の測定値について、溶媒のみを添加した系 (対照区) の測定値に対する被験物質添加区の測定値の比をもとめる。そして、その値が例えば0.8 \sim 1.2の範囲内であれば、その被験物質添加区におけるリガン
20 ド応答性レポーター遺伝子の発現量の測定値を、リガンド応答性転写調節因子の転写促進能に対する被験物質のアゴニスト活性評価またはアンタゴニスト活性評価のために選択する。当該比が、例えば0.8未満のような小さい値となる場合は、被験物質が細胞毒性を有する可能性等が考えられ、一方、例えば1.2を超えるような大きい値となる場合は、被験物質が、遺伝子の転写調節系に対してリガン
25 ド応答性転写調節因子を介さない活性を有する可能性等が考えられる。ただし、リガンド応答性レポーター遺伝子の発現量の測定値を選択するために適した当該比の範囲は、使用される本発明細胞の性質や測定の条件によって異なり、前記の例示数値に限定されるものではない。

次いで、このようにして選択された被験物質添加区のリガンド応答性レポータ

一遺伝子の発現量の測定値が、溶媒のみを添加した系（対照区）の測定値よりも高い場合には、該被験物質が、本発明細胞の測定対象のリガンド応答性転写調節因子の転写促進能に対してアゴニスト活性を有すると評価することができる。このとき、選択されたリガンド応答性レポーター遺伝子の発現量の測定値を、その試験区における細胞数レポーター遺伝子の発現量の測定値に基づいて補正し、得られた補正值をもとに被験物質の活性を評価してもよい。

また、例えば、本発明細胞を測定対象のリガンド応答性転写調節因子のリガンドの存在下、または、該リガンドと被験物質との存在下に培養し、それぞれ前記と同様の方法でリガンド応答性レポーター遺伝子および細胞数レポーター遺伝子の発現量を測定する。細胞数レポーター遺伝子の発現量の測定値について、リガンドのみを添加した系の測定値に対するリガンドおよび被験物質添加区の測定値の比をもとめる。そして、その値が例えば0.8～1.2の範囲内であれば、その被験物質添加区におけるリガンド応答性レポーター遺伝子の発現量の測定値を、リガンド応答性転写調節因子の転写促進能に対する被験物質の活性評価のために選択する。このようにして選択されたリガンドおよび被験物質添加区のリガンド応答性レポーター遺伝子の発現量の測定値が、リガンドのみを添加した系（対照区）の測定値よりも低い場合には、該被験物質が、本発明細胞の測定対象のリガンド応答性転写調節因子の転写促進能に対してアンタゴニスト活性を有すると評価することができる。このとき、選択されたリガンド応答性レポーター遺伝子の発現量の測定値を、その試験区における細胞数レポーター遺伝子の発現量の測定値に基づいて補正し、得られた補正值をもとに被験物質のアンタゴニスト活性を評価してもよい。

本発明細胞を用いることにより、リガンド応答性レポーター遺伝子の発現量と細胞数レポーター遺伝子の発現量とが、同じ細胞抽出液を用いて測定できることから、試験操作のばらつきや、被験物質の細胞に対する影響等による細胞数の変化を煩雑な操作を要することなく把握でき、よって、適切な測定値を選択できると共に、実測値を容易に補正することもでき、従って、リガンド応答性転写調節因子の転写促進能に対する被験物質の活性をより簡便で精度高く測定することが可能となる。また、本発明細胞は凍結保存が可能であり必要に応じて起眠して使

用することから、試験毎に要する本発明細胞の調製作業（レポーター遺伝子導入操作、細胞選抜操作等）を省くことができ、また、一定の性能の細胞を使用して再現性よく測定することも可能となる。

以下に、実施例および試験例により、本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例1 リガンド応答性レポーター遺伝子含有プラスミドの構築

ラットのゲノムDNAをテンプレートとし、塩基配列 5'-

gcgctagcatggtagcgccttgtcagcc-3'（配列番号1）からなるオリゴヌクレオチド

および塩基配列 5'-gcaagcttgagtactgacctagcgagag-3'（配列番号2）からなる

オリゴヌクレオチドをプライマーとしてPCRを行なうことにより、ラットのグルタチオンS-トランスフェラーゼYaサブユニット遺伝子の5'上流領域由来のプロモーター領域（転写開始点を1として、-164番目から+53番目までの塩基からなる領域）（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 3826-3830（1990））を含むDNAを増幅しこれをクローニングした。クローニングされた前記DNAを、レポータープラスミドpGV-P（東洋インキ社販売；ホタルルシフェラーゼ遺伝子を含む。）のHindIII部位とNheI部位との間に挿入して、プラスミドpGV-Yaを得た。

一方、ラットグルタチオンS-トランスフェラーゼYaサブユニット遺伝子の5'上流領域に存在するアリルヒドロカーボンレセプターの認識配列（即ち、ダイオキシン応答配列：Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 3826-3830（1990））を含む塩基配列からなる以下の2種のオリゴヌクレオチドを合成した。

オリゴヌクレオチドA；5'-ctcaggcatgttgcggtgcatccctgaggccagccgagct-3'（配列番号3）

オリゴヌクレオチドB；5'-cggctggcctcagggatgcacgcaacatgcctgagagct-3'（配列番号4）

次いで、前記オリゴヌクレオチドAとBのそれぞれにT4ポリヌクレオチドキナーゼを作用させて5'末端をリン酸化した後、アニーリングして2本鎖DNAとした。該2本鎖DNAをアガロースゲル電気泳動で精製した後、ライゲーション反応を行って該2本鎖DNAが5つタンデムに連結されてなるDNA（以下、XREx5と記

す。)を得た。該DNA XREx5を、前記したプラスミドpGV-YaのSacI切断部位に挿入して、アリルハイドロカーボンレセプターの認識配列(即ち、ダイオキシン応答配列)と転写開始に必要な塩基配列との下流にホタルルシフェラーゼ遺伝子が接続されてなるレポーター遺伝子含有プラスミドpGV-Ya-XREx5(リガンド応答性レポーター遺伝子含有プラスミド:図1)を得た。

実施例2 細胞数レポーター遺伝子含有プラスミドの調製および本発明細胞の作製 I

Hepalclc7細胞(ATCCから入手)を 5×10^5 細胞ずつ2枚の直径10cmシャーレに播き、 α MEM培地に牛胎児血清を10(v/v)%となるように添加した培地(以下、10%血清含有 α MEM培地と記す。)中、37°C、5% CO₂存在下に一晚培養した。尚、本実施例においては、以下の培養は全て37°C、5% CO₂存在下で実施した。

一方、実施例1で構築されたプラスミドpGV-Ya-XREx5(リガンド応答性レポーター遺伝子含有プラスミド)をBamHIで消化した。また、細胞数レポーター遺伝子として用いるウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子を含むプラスミドpRL-TK(細胞数レポーター遺伝子含有プラスミド:東洋インキ社販売)をBamHIで消化し、ネオマイシン耐性(アミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ)遺伝子含有プラスミドpRc/RSV(INVITROGEN社製)をHindIIIで消化した。次いで、これら3種の消化されたプラスミド、すなわち、BamHI消化されたpGV-Ya-XREx5 2.8 μ g、BamHI消化されたpRL-TK 2.8 μ gおよびHindIII消化されたpRc/RSV 0.5 μ gと、 α MEM培地300 μ lを混合し(混合液A)、一方、リポフェクチン(GIBCO-BRL社製)36 μ lと α MEM培地300 μ lを混合し(混合液B)、それぞれ室温で30分間放置した後、混合液Aと混合液Bを混合して室温で10分間放置した。次に、上記のように一晚培養されたHepalclc7細胞を α MEM培地で1回洗浄した後、これに前記の混合液(A+B)にさらに5.4 mlの α MEM培地を加え混合した液を添加し、5時間培養した。次いで、培地を10%血清含有 α MEM培地に交換し、さらに一晚培養した。続いて、細胞をシャーレから剥がして回収し、回収された細胞を10%血清含有 α MEM培地に懸濁して全量を100mlとし、得られた細胞懸濁液を96ウェルプレートに100 μ l/ウェルの割合で播種した。このプレートを一晩培

養した後、geneticin（以下、G418と記す。）を1.6 mg/mlの濃度となるように10%血清含有 α MEM培地に溶解させた培地を、100 μ l/ウェルの割合で添加した（G418終濃度800 μ g/ml）。さらに3週間培養を続けて、その間、培地を、800 μ g/mlのG418を含む10%血清含有 α MEM培地に、1回/週の割合で交換した。培地の容量は200 μ l/ウェルとした。3週間後に、コロニー形成がみとめられたウェルから細胞を剥がして回収し（192ウェル分）、回収された細胞を3分割してそれぞれ別のプレートに播種し、培養を4日間続けた。次に、1番目のプレートにはDMSOのみを添加し（溶媒対照）、2番目のプレートにはDMSOに溶解させた3-メチルコラントレン（以下、3-MCと記す。）を3-MCの終濃度が10 μ Mとなるように加えて、それぞれ一晩培養を続けた。また、3番目のプレートはマスタープレートとして何も添加せずにそのまま培養を続けた。DMSOまたは3-MCを添加したそれぞれのプレートの各ウェルから培地を除き、PBS(-)（11中、塩化ナトリウム：8000 mg、塩化カリウム：200 mg、リン酸一水素ナトリウム（無水）：1150 mg、リン酸二水素ナトリウム（無水）：200 mg、日水製薬社販売）で2回ウェルを洗浄した後、5倍に希釈したピッカジーンデュアルキット（東洋インキ社販売）の細胞溶解液を15 μ l/ウェルずつ加えて室温にて30分以上放置して細胞を溶解させ、細胞抽出液を得た。本プレートを、酵素基質自動インジェクター付きルミノメーターLB 96 P（ベルトールド社製）にセットし、ピッカジーン発光試薬IIおよびシーパンジー発光試薬（ピッカジーンデュアルキット、東洋インキ社販売）を各々50 μ lずつ自動分注して連続的に発光量を測定した。3-MC添加によるホタルルシフェラーゼ遺伝子（リガンド応答性レポーター遺伝子）の発現量の増大率の高い方から6クローンを選び、相当するクローンの細胞をマスタープレートから分割して播種した。得られた細胞を用いて同様にルシフェラーゼアッセイを行い、ホタルルシフェラーゼ遺伝子の発現量が3-MC添加によって2倍以上増大した4クローンを選んだ。さらに、このようにして選ばれた4クローンについて、前記同様の細胞播種およびルシフェラーゼアッセイを行い、ホタルルシフェラーゼ遺伝子の発現量が3-MC添加によって約10倍増大したクローンを選んだ。

Hepalclc7細胞 (ATCC) の 1×10^6 個を直径10cmシャーレに播き、実施例2と同様に10%血清含有 α MEM培地中、37°Cにて、5%CO₂存在下一晩培養した。尚、本実施例において、以下の培養は全て37°C、5%CO₂存在下で実施した。

一方、実施例1で構築されたリガンド応答性レポーター遺伝子含有プラスミド
5 pGV-Ya-XREx5をBamHIで消化した。また、細胞数レポーター遺伝子含有プラスミドpRL-TK (東洋インキ社販売) をBamHIで消化し、ネオマイシン耐性 (アミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ) 遺伝子含有プラスミドpRc/RSV
(INVITROGEN社製) をHindIIIで消化した。次いで、これら3種の消化されたプラスミド、すなわち、BamHI消化されたpGV-Ya-XREx5 5.6 μ g、BamHI消化された
10 pRL-TK 5.6 μ gおよびHindIII消化されたpRc/RSV 1 μ gと α MEM培地600 μ lを混合し (混合液C)、一方、リポフェクチン (GIBCO-BRL社製) 72 μ lと α MEM培地600 μ lを混合し (混合液D)、それぞれ室温で30分間放置した後、混合液Cと混合液Dを混合して室温で10分間放置した。次に、上記のように一晩培養された
15 Hepalclc7細胞を α MEM培地で1回洗浄した後、これに前記の混合液 (C + D) にさらに10.8 mlの α MEM培地を加え混合した液の半量を添加し、5時間培養した。次いで、培地を10%血清含有 α MEM培地に交換し、さらに2日間培養した。続いて、細胞をシャーレから剥がして回収し、回収された細胞を10%血清含有 α MEM培地に懸濁して全量を100mlとし、得られた細胞懸濁液を96ウェルプレートに100 μ l/ウェルの割合で播種した。このプレートを一晩培養した後、
20 G418を10%血清含有 α MEMに3.2 mg/mlの濃度となるように溶解させた培地を100 μ l/ウェルの割合で添加した (G418終濃度1.6 mg/ml)。さらに培養を続け、その間、培地を、800 μ g/mlのG418を含む10%血清含有 α MEMに、1回/4~5日間の割合で交換した。培地の容量は200 μ l/ウェルとした。培養15日後にほとんどのウェルでコロニーがみとめられたので、4枚のプレートから細胞を剥がして回収し (384ウェル分)、回収された細胞を3分割してそれぞれ別のプレートに播種し、さらに1日間培養した。次に、1番目のプレートにはDMSOのみを添加し (溶媒対照)、2番目のプレートにはDMSOに溶解させた3-MCを終濃度2 μ Mとなるように加えて、それぞれ一晩培養を続けた。尚、DMSOまたは3-MCのDMSO溶液は、各ウェルでのDMSOの終濃度が0.04%となるように添加した。3番目のプレートはマスター

プレートとしてそのまま培養を続けた。DMSOまたは3-MCを添加したそれぞれのプレートの各ウェルから培地を除き、PBS(-)で2回ウェルを洗浄した後、5倍に希釈した細胞溶解液を20 μ l/ウェル加えて室温で30分間以上放置して細胞を溶解させ、細胞抽出液を得た。得られた細胞抽出液10 μ lを96ウェル白色プレートに移し、

5 本プレートを、酵素基質自動インジェクター付きルミノメーターLB96P（ベルトールド社製）にセットし、ピッカジーン発光試薬（ホタルルシフェラーゼ基質溶液PGL100、東洋インキ社販売）を50 μ lずつ自動分注して発光量を測定した。3-MC添加によるホタルルシフェラーゼ遺伝子（リガンド応答性レポーター遺伝子）の発現量の増大率が高く、且つ発光量の測定値の大きいクローン4個を選んだ。該4クローンについて、マスタープレートから相当するクローンの細胞を増やした後、各々1ウェルあたり約1細胞となるように96ウェルプレート2枚に播種し、G418を800 μ g/ml含む10%血清含有 α MEM中にて培養を続けた。その間、約5日間に1回培地を交換した。2週間後に、前記の4クローン各々について、単一細胞から生じたコロニー（シングルコロニー）を12個選び、これを前述したように3

10 分割して、そのうち2つはルシフェラーゼ発光測定用兼培養用96ウェルプレート（コーニングコースター社製 #3903）に、残りの一つは透明な48ウェルプレートに播種して1日間培養した。次に、1番目のプレートにはDMSOのみを添加し（溶媒対照）、2番目のプレートには3-MCを終濃度2 μ Mとなるように加えて、それぞれ一晩培養を続けた。DMSOまたは3-MCを添加したプレートの各ウェルから培地を除き、PBS(-)で2回ウェルを洗浄した後、5倍希釈した細胞溶解液を15 μ l/ウェルずつ加えて室温で約1時間放置して細胞を溶解させ、細胞抽出液を得た。得られた抽出液入りプレートを、酵素基質自動インジェクター付きルミノメーターLB96P（ベルトールド社製）にセットし、ピッカジーン発光試薬Ⅱおよびシーパンジー発光試薬（ピッカジーンデュアルキット、東洋インキ社販売）を各々50 μ l

25 ずつ自動分注して連続的に発光量を測定した。全クローンともウミシイタケルシフェラーゼの活性が極めて低く、ウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子が導入されていないと判断された。そこで、3-MC添加によるホタルルシフェラーゼ遺伝子（リガンド応答性レポーター遺伝子）の発現量の増大率が良好であったクローン1個について、再度ウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子の導入を行った。すなわ

ち、当該クローンの細胞を1枚当たり 1×10^6 個となるよう直径10cmシャーレに播き、10%血清含有 α MEM培地中にて一晚培養した。一方、プラスミドpRL-TKをBamHIで消化し、また、プラスミドpUC-BSD（科研製薬社販売；ブラストサイジンS（以下、BSDと記す。）耐性遺伝子を含む。）をEcoRIで消化した。これらの2種の消化されたプラスミド、すなわち、BamHI消化されたpRL-TK $2 \mu\text{g}$ およびEcoRI消化されたpUC-BSD $0.5 \mu\text{g}$ と α MEM培地 $300 \mu\text{l}$ を混合し（混合液E）、一方、リポフェクチン（GIBCO-BRL社製） $36 \mu\text{l}$ と α MEM培地 $300 \mu\text{l}$ を混合し（混合液F）、それぞれ室温で約40分間放置した後、混合液Eと混合液Fを混合して室温で約15分間放置した。次に、上記のように一晚培養されたHeaPalcl7細胞を α MEM培地で1回洗浄した後、これに前記の混合液（E + F）にさらに α MEM培地 4.4 ml を加え混合した液を添加し、6時間培養した。次に、培地を、それぞれ終濃度100国際単位/mlのペニシリンおよび $100 \mu\text{g/ml}$ ストレプトマイシンを含む10%血清含有 α MEM培地（以下、P-S血清含有 α MEM培地と記す。）に交換し、一晚培養した。続いて、細胞をプレートから剥がして回収し、回収された細胞をP-S血清含有 α MEM培地に懸濁して全量を 100 ml とし、得られた細胞懸濁液を96ウェルプレート10枚に $100 \mu\text{l}$ /ウェルの割合で播種した。これらのプレートを一晚培養した後、培地を除き、BSDを $16 \mu\text{g/ml}$ 、G418を $800 \mu\text{g/ml}$ となるように溶解させた10%血清含有 α MEM培地を、 $200 \mu\text{l}$ /ウェルの割合で各ウェルに添加し、4日間～5日間に1回の割合で培地交換を行いながら培養を続けた。約2週間後に、コロニーのみとめられたウェル（72ウェル）から細胞を剥がして回収し、回収された細胞を3分割して、そのうち2つはルシフェラーゼ発光測定用兼培養用96ウェルプレート（コーニングコースター社製 #3903）に、残りの一つは透明な24ウェルプレートに播種し一晚培養した。次に、1番目のプレートにはDMSOのみを添加し（溶媒対照）、2番目のプレートには3-MCを終濃度 $2 \mu\text{M}$ となるように加えて、それぞれ6時間半培養を続けた。尚、3番目のプレートはマスタープレートとしてそのまま培養を続けた。DMSOまたは3-MCを添加したプレートの各ウェルから培地を除き、PBS(-)で2回ウェルを洗浄した後、5倍に希釈した細胞溶解液を $15 \mu\text{l}$ /ウェル加えて室温で1時間以上放置して細胞を溶解させ、細胞抽出液を得た。得られた細胞抽出液入りのプレート量を酵素基質自動インジェクター

付きルミノメーターLB96P（ベルトールド社製）にセットし、ピッカジーン
発光試薬Ⅱおよびシーパンジー発光試薬（ピッカジーンデュアルキット、東洋イ
ンキ社販売）を各々50 μ lずつ自動分注して連続的に発光量を測定した。3-MC添
加によるホタルルシフェラーゼ遺伝子（リガンド応答性レポーター遺伝子）の発
5 現量の増大率が高く、ウミシイタケルシフェラーゼによる発光量の測定値がDMSO
添加ウェルと3-MC添加ウェルとの間でほとんど変わらず、且つ各発光量の測定値
の大きいクローンを5個選んだ。このうち2個についてマスタープレートから相当
するクローンの細胞を分割して播種し、同様にルシフェラーゼアッセイを行い、
両ルシフェラーゼによる発光量の測定結果が前記とほぼ同様の傾向を示した1ク
10 ローンを選んだ。

実施例4 レポーターアッセイにおける本発明細胞の使用（その1）

実施例2において選抜されたクローンを、96ウェルプレートに40,000細胞/ウ
ェルの割合で播き、一晚培養した。2,3,7,8-テトラクロロジベンゾー p -ジオキ
15 シン（以下、TCDDと記す。）の50 μ g/mlノナン溶液（関東化学社製）をDMSOで希
釈し、得られた希釈液を上記細胞に添加した。培養を続けて、約40時間後に培地
を除き、PBS(-)で2回ウェルを洗浄した後、細胞溶解液を20 μ l/ウェルずつ加え、
室温で30分以上放置して細胞を溶解させた後、該プレートを-80℃で凍結保存し
た。この凍結保存プレートを室温にて放置し、融解した細胞抽出液の10 μ lを白
20 色96ウェルプレートに移した。本プレートを酵素基質自動インジェクター付きル
ミノメーターLB96P（ベルトールド社製）にセットし、ピッカジーン発光試
薬Ⅱおよびシーパンジー発光試薬（ピッカジーンデュアルキット、東洋インキ社
販売）を各々50 μ lずつ自動分注して連続的に発光量を測定した。結果を表1に
示す。

表 1

TCDD終濃度 (pg/ml)	ホタルシフェラーゼ 発光量 (pGV-Ya-XREx5由来)		ウミシタケルシフェラーゼ 発光量 (pRL-TK由来)	
	測定値 ($\times 10^4$)	比率	測定値 ($\times 10^6$)	比率
0	0.486	1.0	1.17	1.0
0.02	0.517	1.1	1.15	1.0
0.2	0.532	1.1	1.10	0.9
2	0.873	1.8	1.08	0.9
20	3.14	6.5	0.894	0.8
200	4.46	9.2	0.783	0.7
2000	4.17	8.6	0.691	0.6
20000	4.49	9.2	0.728	0.6

5 実施例 5 レポーターアッセイにおける本発明細胞の使用 (その 2)

実施例 3 にて選抜したクローンを、96 ウェルプレートに 5,000 細胞 / 100 μ l 培地 / ウェルの割合で播き、一晚培養した。Ah レセプターの代表的活性化化合物である 3-MC およびベンゾ [a] ピレン、ならびに Ah レセプターを活性化しない化合物であるデキサメタゾンを、それぞれ DMSO に溶解させ、得られた溶解液を、

10 培地中の化合物の終濃度が 1、10、 10^2 、 10^3 、 10^4 、または 5×10^4 nM となるように上記培養細胞に添加した。尚、前記の溶解液は、培地中の DMSO の終濃度が

0.25 (v/v) % となるように調製して添加した。化合物添加の約 6 時間後に培地を除き、ウェルを PBS (-) で 2 回洗浄した後、5 倍希釈した細胞溶解液を 15 μ l / ウェル加え、室温で約 1 時間放置して得られた細胞抽出液入りプレートを -80°C で凍結保存

15 した。この凍結保存プレートを室温で放置して、融解した細胞抽出液が入ったプレートを、酵素基質自動インジェクター付きルミノメーター LB 96 P (ベルトールド社製) にセットし、ピッカジーン発光試薬 II およびシーパンジー発光試薬 (ピッカジーンデュアルキット、東洋インキ社販売) を各々 50 μ l ずつ自動分注して連続的に発光量を測定した。結果を表 2 から 4 に示す。

表 2

デキサメタゾン 終濃度 (nM)	ホタルシフェラーゼ 発光量 (pGV-Ya-XREx5由来)		ウシイタケルシフェラーゼ 発光量 (pRL-TK由来)	
	測定値 ($\times 10^2$)	比率	測定値 ($\times 10^4$)	比率
0	2.87	1.0	3.95	1.0
1	3.71	1.3	3.89	1.0
10	3.54	1.2	3.85	1.0
100	3.39	1.2	3.40	0.9
1000	3.22	1.1	3.24	0.8
10000	3.53	1.2	3.97	1.0
50000	3.73	1.3	4.24	1.1

5

表 3

ベンゾ [a]ピレン 終濃度 (nM)	ホタルシフェラーゼ 発光量 (pGV-Ya-XREx5由来)		ウシイタケルシフェラーゼ 発光量 (pRL-TK由来)	
	測定値 ($\times 10^3$)	比率	測定値 ($\times 10^4$)	比率
0	0.251	1.0	2.94	1.0
1	0.414	1.7	2.65	0.9
10	0.928	3.7	2.76	0.9
100	1.72	6.9	2.44	0.8
1000	3.12	12	2.56	0.9
10000	4.54	18	2.44	0.8
50000	5.76	23	2.21	0.8

表 4

3-MC 終濃度 (nM)	ホタルシフェラーゼ [®] 発光量 (pGV-Ya-XREx5由来)		ウシイタケルシフェラーゼ [®] 発光量 (pRL-TK由来)	
	測定値 ($\times 10^3$)	比率	測定値 ($\times 10^4$)	比率
0	0.374	1.0	4.81	1.0
1	1.17	3.1	4.48	0.9
10	2.19	5.9	4.62	1.0
100	3.83	10	4.33	0.9
1000	4.89	13	4.17	0.9
10000	8.52	23	4.03	0.8
50000	8.68	23	4.10	0.9

5

発明の効果

本発明により、リガンド応答性転写調節因子の転写促進能に対する被験物質の活性をより簡便で精度高く測定することが可能となる。

10

配列表フリーテキスト

SEQ ID NO: 1

Designed oligonucleotide primer for PCR

15

SEQ ID NO: 2

Designed oligonucleotide primer for PCR

SEQ ID NO: 3

20

Designed oligonucleotides to synthesize DNA containing dioxin responsive element

SEQ ID NO: 4

Designed oligonucleotides to synthesize DNA containing dioxin
responsive element

請 求 の 範 囲

1. リガンド応答性転写調節因子をコードする遺伝子を発現し、以下の (a) および (b) の遺伝子が染色体に導入されてなる細胞：
- 5 (a) 前記リガンド応答性転写調節因子の認識配列と転写開始に必要な塩基配列との下流に接続されてなるレポーター遺伝子、
- (b) 前記レポーター遺伝子のコードするタンパク質と判別可能なタンパク質をコードし、前記リガンド応答性転写調節因子のリガンドの接触により転写活性
- 10 が変化しないプロモーターの下流に接続されてなるレポーター遺伝子。
2. アリルハイドロカーボンレセプター遺伝子を発現し、以下の (a) および (b) の遺伝子が染色体に導入されてなる細胞：
- (a) アリルハイドロカーボンレセプターの認識配列と転写開始に必要な塩基配列との下流に接続されてなるレポーター遺伝子、
- 15 (b) 前記レポーター遺伝子のコードするタンパク質と判別可能なタンパク質をコードし、前記リガンド応答性転写調節因子のリガンドの接触により転写活性が変化しないプロモーターの下流に接続されてなるレポーター遺伝子。
3. アリルハイドロカーボンレセプター遺伝子を発現し、以下の (a) および (b) の遺伝子が染色体に導入されてなる細胞：
- 20 (a) アリルハイドロカーボンレセプターの認識配列と転写開始に必要な塩基配列との下流に接続されてなるレポーター遺伝子、
- (b) 前記レポーター遺伝子のコードするタンパク質と判別可能なタンパク質をコードし、ダイオキシンの接触により転写活性が変化しないプロモーターの下流に接続されてなるレポーター遺伝子。
- 25 4. アリルハイドロカーボンレセプター遺伝子およびArnt遺伝子を発現し、以下の (a) および (b) の遺伝子が染色体に導入されてなる細胞：
- (a) アリルハイドロカーボンレセプターの認識配列と転写開始に必要な塩基配列との下流に接続されてなるレポーター遺伝子、
- (b) 前記レポーター遺伝子のコードするタンパク質と判別可能なタンパク質

をコードし、前記リガンド応答性転写調節因子のリガンドの接触により転写活性が変化しないプロモーターの下流に接続されてなるレポーター遺伝子。

5 5. リガンド応答性転写調節因子の転写調節を受けるレポーター遺伝子の発現量を測定するレポーターアッセイにおいて、リガンド応答性転写調節因子の転写促進能に対する被験物質のアゴニスト活性またはアンタゴニスト活性を評価するための請求項 1、2、3 または 4 のいずれか 1 項に記載の細胞の使用。

6. リガンド応答性転写調節因子の転写促進能に対する被験物質のアゴニスト活性を評価する方法であって、

10 (1) 請求項 1、2、3 または 4 のいずれか 1 項に記載の細胞を被験物質の存在下に培養し、当該細胞におけるレポーター遺伝子の発現量を測定する工程、

 (2) リガンドの接触により転写活性が変化しないプロモーターの下流に接続されてなるレポーター遺伝子の発現量の測定値に基づいて、リガンド応答性転写調節因子の認識配列と転写開始に必要な塩基配列との下流に接続されてなるレポーター遺伝子の発現量の測定値を選択する工程、

15 (3) 工程 (2) で選択されたレポーター遺伝子の発現量の測定値が、前記被験物質非存在下における当該レポーター遺伝子の発現量の測定値よりも高い場合に、該被験物質が前記リガンド応答性転写調節因子の転写促進能に対してアゴニスト活性を有すると評価する工程、
 を含む方法。

20 7. リガンド応答性転写調節因子の転写促進能に対する被験物質のアンタゴニスト活性を評価する方法であって、

 (1) 請求項 1、2、3 または 4 のいずれか 1 項に記載の細胞を、該リガンド応答性転写調節因子のリガンドと被験物質との存在下に培養し、当該細胞におけるレポーター遺伝子の発現量を測定する工程、

25 (2) リガンドの接触により転写活性が変化しないプロモーターの下流に接続されてなるレポーター遺伝子の発現量の測定値に基づいて、リガンド応答性転写調節因子の認識配列と転写開始に必要な塩基配列との下流に接続されてなるレポーター遺伝子の発現量の測定値を選択する工程、

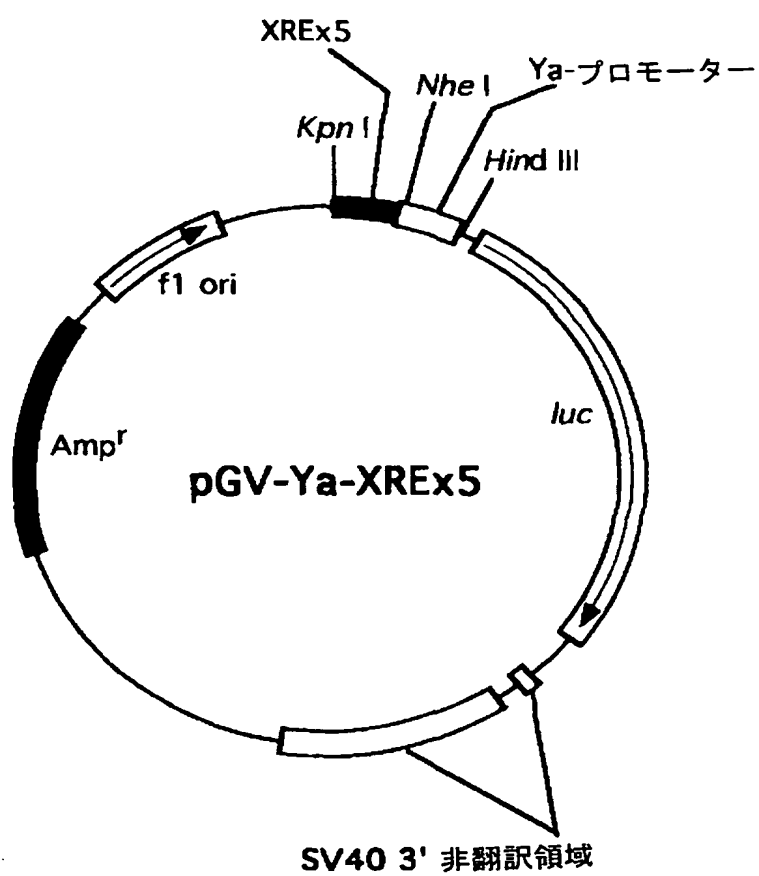
 (3) 工程 (2) で選択されたレポーター遺伝子の発現量の測定値が、前記リ

ガンドは存在し前記被験物質は存在しない条件下における当該レポーター遺伝子の発現量の測定値よりも低い場合に、該被験物質が前記リガンド応答性転写調節因子の転写促進能に対してアンタゴニスト活性を有すると評価する工程、を含む方法。

- 5 8. 請求項1、2、3または4のいずれか1項に記載の細胞を含有する測定キット。

1 / 1

図 1



THIS PAGE BLANK (USPTO)

配 列 表

- <110> Sumitomo Chemical Co. Ltd.
- 5 <120>
- <130>
- <150> JP 11/002807
- 10 <151> 1999-01-08
- <160> 4
- <210> 1
- 15 <211> 28
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220>
- 20 <223> Designed oligonucleotide primer for PCR
- <400> 1
- gcgctagcat ggtagcgcc tgtcagcc 28
- 25 <210> 2
- <211> 28
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

THIS PAGE BLANK (USPTO)

2 / 2

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer for PCR

<400> 2

5 gcaagcttga gtactgacct agcgagag 28

<210> 3

<211> 39

<212> DNA

10 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotides to synthesize DNA containing dioxin
responsive element

15

<400> 3

ctcaggcatg ttgcgtgcat ccctgaggcc agccgagct 39

<210> 4

20 <211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

25 <223> Designed oligonucleotides to synthesize DNA containing dioxin
responsive element

<400> 4

cggctggcct cagggatgca cgcaacatgc ctgagagct 39

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/00010

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N 15/12, C12N 5/10, G01N33/50, G01N33/15

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N 15/12, C12N 5/10, G01N33/50, G01N33/15

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PA	J.Stables, et al. "Development of a dual glow-signal firefly and renilla luciferase assay reagent for the analysis of G-protein coupled receptor signalling", Journal of Receptor & Signal Transduction Research (Nov.1999), Vol.19, No.1-4, p.395-410	1-8
PA	Rengin Duan, et al. "Transcriptional activation of c-fos protooncogene by 17 β -estradiol: Mechanism of aryl hydrocarbon receptor-mediated inhibition", Molecular Endocrinology (Sep.1999), Vol.13, No.9, p.1511-1521	1-8
A	M.S.Denison, et al. "Carbonyl, a Carbamate Insecticide, is a Ligand for the Hepatic Ah(Dioxin) Receptor", Toxicology and Applied Pharmacology(1998), Vol.152, No.2, p.406-414	1-8
A	Hans-Joachim Schmitz, et al. "2, 3, 7, 8-Tetrafluorodibenzo -p- dioxin: a potent agonist of the murine dioxin receptor", Environmental Toxicology and Pharmacology(1997), Vol.3, No.2, p.105-113	1-8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
04 April, 2000 (04.04.00)

Date of mailing of the international search report
18 April, 2000 (18.04.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/00010

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Mark Merchant, et al., "In Vitro inhibition of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin induced activity by α -naphthoflavone and 6-methyl-1, 3, 8-trichlorodibenzofuran using an aryl hydrocarbon (Ah)-responsive construct", Biochemical Pharmacology (1995), Vol.50, No.5, p.663-668	1-8
A	Debie Hoivik, et al. "Estrogen does not inhibit 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-mediated effects in MCF-7 and hepa 1c1c7 cells", The Journal of Biological Chemistry (1997), Vol.272, No.48, p.30270-30274	1-8
A	A.J.Murk, et al. "Chemical-activated luciferase gene expression (CALUX): A novel in vitro bioassay for Ah receptor active compounds in sediments and pore water", Fundamental and Applied Toxicology (1996), Vol.33, No.1, p.149-160	1-8
A	Venkatesh Krishanan, et al. "Molecular mechanism of inhibition of estrogen-induced cathepsin D gene expression by 2, 3, 7, 8- tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in MCF7 cells", Molecular and Cellular Biology (1995), Vol.15, o.12, p.6710-6719	1-8
A	Anna Wilhelmsson, et al. "Agonistic and antagonistic effects of α -naphthoflavone on dioxin ewceptor function", The Journal of Biological Chemistry (1994), Vol.269, No.29, p.19028-19033	1-8

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N 15/12, C12N 5/10, G01N33/50, G01N33/15

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N 15/12, C12N 5/10, G01N33/50, G01N33/15

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PA	J. Stables, et al. "Development of a dual glow-signal firefly and renilla luciferase assay reagent for the analysis of G-protein coupled receptor signalling", Journal of Receptor & Signal Transduction Research (Nov. 1999), Vol. 19, No. 1-4, p. 395-410	1-8
PA	Renqin Duan, et al. "Transcriptional activation of c-fos protooncogene by 17 β -estradiol: Mechanism of aryl hydrocarbon receptor-mediated inhibition", Molecular Endocrinology (Sep. 1999), Vol. 13, No. 9, p. 1511-1521	1-8

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

04.04.00

国際調査報告の発送日

18.04.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

富永 みどり

4N

9152

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	M. S. Denison, et al. "Carbonyl, a Carbamate Insecticide, is a Ligand for the Hepatic Ah(Dioxin) Receptor", Toxicology and Applied Pharmacology(1998), Vol. 152, No. 2, p. 406-414	1-8
A	Hans-Joachim Schmitz, et al. "2, 3, 7, 8-Tetrafluorodibenzo-p-dioxin: a potent agonist of the murine dioxin receptor", Environmental Toxicology and Pharmacology(1997), Vol. 3, No. 2, p. 105-113	1-8
A	Mark Merchant, et al. "In Vitro inhibition of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin induced activity by α -naphthoflavone and 6-methyl-1, 3, 8-trichlorodibenzofuran using an aryl hydrocarbon (Ah)-responsive construct", Biochemical Pharmacology(1995), Vol. 50, No. 5, p. 663-668	1-8
A	Debie Hoivik, et al. "Estrogen does not inhibit 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-mediated effects in MCF-7 and hepa 1c1c7 cells", The Journal of Biological Chemistry(1997), Vol. 272, No. 48, p. 30270-30274	1-8
A	A. J. Murk, et al. "Chemical-activated luciferase gene expression(CALUX): A novel in vitro bioassay for Ah receptor active compounds in sediments and pore water", Fundamental and Applied Toxicology(1996), Vol. 33, No. 1, p. 149-160	1-8
A	Venkatesh Krishanan, et al. "Molecular mechanism of inhibition of estrogen-induced cathepsin D gene expression by 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin(TCDD) in MCF7 cells", Molecular and Cellular Biology(1995), Vol. 15, No. 12, p. 6710-6719	1-8
A	Anna Wilhelmsson, et al. "Agonistic and antagonistic effects of α -naphthoflavone on dioxin receptor function", The Journal of Biological Chemistry(1994), Vol. 269, No. 29, p. 19028-19033	1-8